



Koncentrationsbestemmelse vha. spektrofotometer

Formål

At afprøve en metode til at bestemme koncentrationen af et farvestof vha. spektrofotometer.

Baggrund

I Bioteknologi 2, side 13, kan I se hvordan man kan bruge et spektrofotometer til at bestemme koncentrationen af celler i en cellekultur.

Man benytter imidlertid også ofte et spektrofotometer til at bestemme koncentrationen af stoffer i opløsning. Det gælder fx ved mange analyser hvor der sker en farvereaktion, som er proportional med koncentrationen af et bestemt stof. Andre eksempler er forsøg hvor man følger en enzymatisk reaktion som fremkalder et farveskift, eller bestemmelse af koncentrationen af protein ved 280 nm, se Kromatografi, Tema 4, Link 2. Tilsvarende absorberer DNA ultraviolet lys ved 260 nm pga. molekylets puriner og pyrimidiner.

Dette forsøg viser princippet i en koncentrationsmåling vha. et farvestof eller en farvet opløsning af et kemikalie fra kemilaboratoriet.

Ud fra en opløsning med en kendt koncentration af det pågældende stof, stamopløsningen, laver man en fortyndingsrække, så man har stoffet i en række kendte koncentrationer.

Ved at måle absorbansen af fortyndingerne kan man lave en standardkurve, dvs. en kurve der viser sammenhængen mellem absorbans og koncentration.

Når man herefter måler absorbansen af en opløsning af stoffet med en ukendt koncentration, kan man aflæse opløsningens koncentration på standardkurven.

Materialer

- Stamopløsning med en kendt koncentration af et kemikalie fra kemilaboratoriet (udleveres af læreren).
- Stativ med 5 reagensglas mærket 1, 2, 3, 4, 5
- 7 kuvetter mærket 0, 1, 2, 3, 4, 5, prøve. Skriv ikke på kuvetterne, men sæt dem på en række på et stykke papir og skriv på dette.
- 5 mL pipette med spidser
- Spektrofotometer
- Prøve med ukendt koncentration af det valgte kemikalie (udleveres af læreren).

Fremgangsmåde

Fremstilling af fortyndingsrække

1. Afpipettér 5 mL demineraliseret vand i reagensglassene 1-4.
2. Afpipettér 2 mL demineraliseret vand i kuvette 0. Dette er referencekuvetten (blank) som bruges til at nulstille spektrofotometret.
3. Afpipettér 5 mL stamopløsning til reagensglas 5.
4. Afpipettér 3 mL stamopløsning i kuvette 5.
5. Afpipettér 5 mL stamopløsning til reagensglas 4. Opbland indholdet af reagensglasset med pipetten.
6. Kassér pipettespidser og påsæt en ny.
7. Overfør 3 mL fra reagensglas 4 til kuvette 4.

8. Overfør 5 mL fra reagensglas 4 til reagensglas 3. Opbland.
9. Kassér pipettespidsen og påsæt en ny.
10. Overfør 3 mL fra reagensglas 3 til kuvette 3.
11. Overfør 5 mL fra reagensglas 3 til reagensglas 2. Opbland og kassér pipettespidsen.
12. Overfør 3 mL fra reagensglas 2 til kuvette 2.
13. Overfør 5 mL fra reagensglas 2 til reagensglas 1. Opbland og kassér pipettespidsen.
14. Overfør 3 mL fra reagensglas 1 til kuvette 1.
15. For hver fortynding er koncentrationen halveret. Beregn koncentrationerne ud fra stamopløsningens koncentration, og skriv dem i resultatskemaet.

Valg af bølgelængde

16. Sæt kuvette 0, referencekuvetten, i spektrofotometret og nulstil.
17. Sæt en af kuvetterne i spektrofotometret og lad det vise et absorbtionsspektrum for kemikaliet.
18. Find absorbtionsspektrets toppunkter, dvs. de bølgelængder hvor absorbansen er størst.
19. Vælg et af toppunkterne som den bølgelængde du måler ved. Noter bølgelængden.

Denne bølgelængde vil give det største udslag og dermed den sikreste bestemmelse. I nogle analyser vil andre stoffer også absorbere lys ved bestemte bølgelængder. Hvis disse stoffers koncentration ændrer sig gennem forsøget, vil det være en fejlkilde ved målingerne, og man må evt. vælge en anden bølgelængde.

Fremstilling af standardkurve

20. Mål absorbansen ved den valgte bølgelængde for hver af fortyndingerne. Noter resultaterne i resultatskemaet.

Kemikalie:			Bølgelængde:			
Glas	1	2	3	4	5	6
Koncentration						
Absorbans						

Figur 1. Resultatskema.

21. Lav et diagram som viser absorbansen ved som funktion af koncentrationen.
22. Lav en tendenslinie gennem målepunkterne. Den bør gå igennem (0,0). Tendenslinien omtales standardkurven.
23. Hvis du bruger regneark, så sæt flueben ved vis ligning i diagram. Hermed får du ligningen for standardkurven.

Måling af en ukendt prøve

1. Din lærer udleverer en prøve af det valgte kemikalie med en ukendt koncentration.
2. Sammenlign med din fortyndingsrække. Hvor høj vil du visuelt bedømme koncentrationen til at være?

3. Sæt en kuvette med demineraliseret vand i spektrofotometret og nulstil.
4. Sæt den ukendte prøve i spektrofotometret og mål absorbansen ved den valgte bølgelængde.
5. Find den målte absorbans på diagrammets y-akse og aflæs hvilken koncentration af stoffet der giver denne absorbans.
6. Stemte det overens med din visuelle bedømmelse?
7. Indsæt den målte absorbans som y-værdi i ligningen for standardkurven og beregn koncentrationen matematisk.
8. Er der overensstemmelse?

Diskuter forskellige anvendelser af metoden.

Noter

- Man kan lave fortyndingsrækker på flere måder. Her er vist en måde hvor man halverer koncentrationen for hver fortynding. Ofte laver man en 10-folds fortynding, dvs. en fortyndingsrække hvor stoffet fortyndes 10 gange for hvert trin. Det gør man ved at afpipettere 9 mL vand i hvert reagensglas og overføre 1 mL fra glas til glas.
En 10-fold fortynding er meget nyttig når man er usikker på hvilket niveau man kommer til at måle ved. Når man finder ud af om man bevæger sig ved de laveste eller de højeste fortyndinger laves en ny fortyndingsrække i det aktuelle område. Denne fortyndingsrække vil typisk være en 2-folds fortynding, som den der er gengivet i forsøget.
- Man bør af principielle grunde lave dobbeltbestemmelse når man laver en standardkurve. Dvs. at man laver to fortyndingsrækker.
- Sammenhængen mellem koncentration og absorbans er lineær ved lavere koncentrationer. Ved højere koncentrationer vil lysets refleksion give et andet mønster. Derfor bør prøver som giver en absorbans på over 1,000 fortyndes før måling.
- Når man måler på mikroorganismer som udfører en proces, vil mediet ofte ændre absorbans gennem forsøget, fx fordi bestemte stoffer forbruges, eller der dannes affaldsstoffer. Derfor må man nulstille med mediet, som det er når man tager prøven. Det gøres ved at filtrere lidt af kulturen gennem et engangs-sterilfilter, som kan monteres på en engangssprøjte.